

高效液相色谱法测定水杨酸及其羟基化产物

任信荣, 邵可声, 唐孝炎

(北京大学环境科学中心 环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 利用高效液相色谱法和荧光检测器建立了水杨酸及其主要的羟基化产物 2,3-二羟基苯甲酸和 2,5-二羟基苯甲酸的测定方法, 并对水杨酸和 H_2O_2 光解反应体系进行了研究。

关键词 高效液相色谱法 荧光检测 水杨酸 羟基化

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-8713(2001)02-0191-02

1 前言

含氧自由基(如 $\cdot\text{OH}$, O_2^- 等)在人体组织中有很大毒性^[1]。研究发现作为常用镇痛剂的阿司匹林(aspirin)在人体代谢过程中水解产生水杨酸(salicylic acid, 简称 SA), SA 与体液中的 $\cdot\text{OH}$ 自由基反应后生成 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, 简称 2,3-DHBA)和 2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, 简称 2,5-DHBA)^[2]。通过测定这些羟基化产物可以间接地研究体内 $\cdot\text{OH}$ 自由基的浓度和产生速率, 类似的方法也可用于测定气相中的 $\cdot\text{OH}$ 浓度^[3]。国外利用高效液相色谱法对水杨酸及其羟基化产物的测定已有一些研究^[4~6], 但大多用紫外和电化学检测器, 其检测灵敏度对于人体内和大气中低浓度的 $\cdot\text{OH}$ 自由基测定显得不够高。本文利用高效液相色谱法和荧光检测器建立了水杨酸及其羟基化产物 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的测定方法, 确定了最优实验条件, 并研究了水杨酸与 H_2O_2 光解反应体系。本方法为 $\cdot\text{OH}$ 自由基的测定提供了一种新的简便途径, 将进一步用于大气 $\cdot\text{OH}$ 自由基的测定和抗自由基药物疗效的确定。

2 实验部分

2.1 实验试剂

2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 购自 Sigma 公司; H_2O_2 (纯度 30%)为国产优级纯; 水杨酸(纯度 99.5%), 无水醋酸钠(纯度 99%), 磷酸二氢钾(纯度 99%)等均为国产分析纯; 色谱级纯水, 二次去离子水的双蒸水。

2.2 实验仪器

高效液相色谱仪为 HP1050 系列产品, 包括脱氧装置, 高压泵, 六通进样阀(100 μL), Hypersil ODS 色谱柱(5 μm 200 mm $\times$ 4.6 mm i.d.), 1046A

型荧光检测器以及 HPCHEM 工作站等。

2.3 色谱条件

流动相为 30 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH 4.9), 流速为 1.0 mL/min, 水杨酸、2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的激发波长均为 237 nm, 三者的最大荧光发射波长分别为 405 nm, 425 nm 和 431 nm。

2.4 实验过程

2.4.1 水杨酸重结晶处理 为了得到更纯的水杨酸以降低试剂背景, 对分析纯的水杨酸用色谱纯的水重结晶 3 次。重结晶在无尘 N_2 气氛中进行, 以防止大气中 O_3 等对其氧化。

2.4.2 水杨酸与 H_2O_2 光解产生的 $\cdot\text{OH}$ 发生反应 配制含水杨酸 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 H_2O_2 50 $\mu\text{mol/L}$ 的混合溶液(以 10 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液为基液), 在紫外汞灯下光解 20 min。然后用高效液相色谱测定水杨酸的浓度变化以及生成的 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的浓度。

3 结果与讨论

3.1 色谱分离

典型的水杨酸及其羟基化产物的色谱图见图 1。由图 1 看出 2,3-DHBA, 2,5-DHBA 和水杨酸可以达到基线分离。

3.2 标准工作曲线和检测限

分别配制一系列浓度在 10 nmol/L ~ 100 nmol/L 范围内的 2,3-DHBA 标准溶液、1 nmol/L ~ 10 nmol/L 范围内的 2,5-DHBA 标准溶液和 1 nmol/L ~ 10 nmol/L 范围内的 SA 标准溶液, 用 HPLC 进行分析, 测定相应的荧光信号, 以相应组分的色谱峰面积(S)对其浓度(C , mol/L)进行线性回归, 得到标准工作曲线分别为: $S_{2,3\text{-DHBA}} = 2.52 \times 10^8 \times C_{2,3\text{-DHBA}} - 3.822$ ($r = 0.991$); $S_{2,5\text{-DHBA}} = 1.321 \times 10^{10} \times C_{2,5\text{-DHBA}} + 1.168$ ($r = 0.998$); $S_{\text{SA}} =$

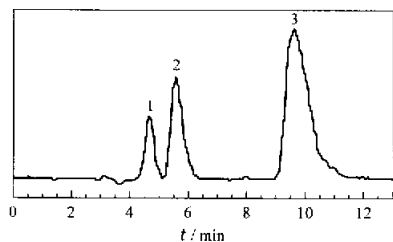


图 1 水杨酸及其羟基化产物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of salicylic acid and its hydroxylated products

1. 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) ($t_R = 4.7 \text{ min}$);
2. 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) ($t_R = 5.7 \text{ min}$);
3. salicylic acid (SA) ($t_R = 9.8 \text{ min}$).

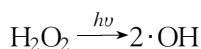
$4.735 \times 10^9 \times C_{SA} - 7.125$ ($r = 0.994$)。三者的检测限 ($S/N = 3$) 分别为: 10 nmol/L (2,3-DHBA), 0.6 nmol/L (2,5-DHBA), 1.0 nmol/L (SA)。这些检测限比利用紫外检测器测定的结果约低 2~3 个数量级^[7,8]。

3.3 重现性

对一定浓度的 2,3-DHBA、2,5-DHBA 和水杨酸标准溶液分别进行多次进样测定。结果表明该方法有较好的精度,三者色谱峰面积的相对偏差分别为 4.86%、2.35% 和 3.25%。

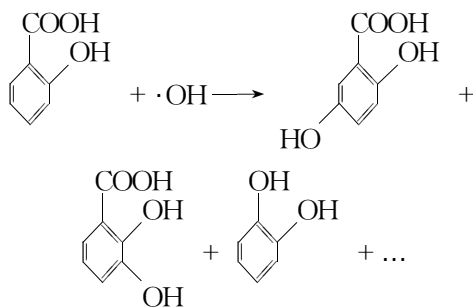
3.4 水杨酸与 H_2O_2 光解体系的研究

H_2O_2 稀溶液在 $\lambda < 360 \text{ nm}$ 的紫外光照射下可以光解生成 $\cdot\text{OH}$ 自由基:



生成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基可以与水杨酸发生反应,生

成 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 以及其他产物。其中 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 是最主要的产物,占 90% 以上^[9]。本实验对此反应体系中生成的 2,3-DHBA、2,5-DHBA 以及未反应的水杨酸进行了测定,得到 2,3-DHBA 和 2,5-DHBA 的产率分别为 45% 和 51%,此结果与文献 3 报道的结果基本接近。



参考文献:

- [1] Kaur H, Halliwell B. *Anal Biochem*, 1994, 220 :11-15
- [2] Grootveld M, Halliwell B. *Biochem Pharmacology*, 1988, 37(2) :271-280
- [3] Chen X, Mopper K. *J Atmos Chem*, 2000, 36(1) :81-105
- [4] Das D K, Cordis G A. *J Chromatogr*, 1991, 536 :273-282
- [5] Coudray C, Talla M, Martin S, et al. *Anal Biochem*, 1995, 227 :101-111
- [6] Jen-Fon J, Meei-Fan L, Yang T C. *J Chromatogr*, 1998, 796 :283-288
- [7] Onodera T, Ashraf M. *J Mol Cell Cardiol*, 1991, 23 :365-370
- [8] Coudray C, Mangournet C, Bouhadjeb S, et al. *J Chromatogr Sci*, 1996, 34 :166-173
- [9] Grootveld M, Halliwell B. *Biochem J*, 1986, 237 :499-504

Determination of Salicylic Acid and Its Hydroxylated Products Using High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection

REN Xin-rong, SHAO Ke-sheng, TANG Xiao-yan

(The State Key Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Center of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector was used to determine salicylic acid (SA) and its main hydroxylated products, 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA). Mobile phase was 30 mmol/L acetate ($\text{pH } 4.9$) and the flow rate was 1.0 mL/min . Low detection limits, 10 nmol/L for 2,3-DHBA, 0.6 nmol/L for 2,5-DHBA and 1.0 nmol/L for SA were obtained. The photolysis system of salicylic acid and H_2O_2 was investigated. The products in the system were measured and the yields were 45% and 51% for 2,3-DHBA and 2,5-DHBA, respectively.

Key words high performance liquid chromatography; fluorescence detection; salicylic acid; hydroxylation